

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer internationalen Patentanmeldung

**Aktenzeichen:**

PCT/DE 02/00583

**Internationaler  
Anmeldetag:**

19. Februar 2002

**Anmelder/Inhaber:**

MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS-  
UND VERTRIEBS GMBH, 14195 Berlin/DE;  
Burghardt Wittig, 14129 Berlin/DE; Christoph  
Stein, 10825 Berlin/DE; Michael Schäfer,  
12205 Berlin/DE; Matthias Schröff,  
14057 Berlin/DE; Claas Jung hans,  
10551 Berlin/DE; Sven Andres  
König Merediz, Madrid/ES.

**Bezeichnung:**

Mittel zur lokalen Schmerzbekämpfung

**Priorität:**

24. Februar 2001 DE 101 09 092.7

**IPC:**

noch nicht festgelegt

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser internationalen Patentanmeldung.**

München, den 4. März 2004  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Wallner

## PCT-ANTRAG

1/6

XI 152/02

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.02.2002 07:18:23 PM

0	Vom Anmeldeamt auszufüllen	<b>PCT/DE 02 / 00583</b> <i>(19.02.02)</i> <b>19. Feb. 2002</b>
0-1	Internationales Aktenzeichen.	
0-2	Internationales Anmeldedatum	
0-3	Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"	<b>RO/DE</b> Deutsches Patent- und Markenamt (German Patent and Trade Mark Office) PCT International Application
0-4	Formular - PCT/RO/101 PCT-Antrag	<b>PCT-EASY Version 2.92</b> (aktualisiert 01.01.2002)
0-4-1	erstellt durch Benutzung von	
0-5	Antragsersuchen  Der Unterzeichneter beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird	
0-6	(Vom Anmelder gewähltes) Anmeldeamt	<b>Deutsches Patent- und Markenamt (RO/DE)</b>
0-7	Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts	<b>XI 152/02</b>
I	Bezeichnung der Erfindung	<b>MITTEL ZUR LOKALEN SCHMERZBEKÄMPFUNG</b>
II	Anmelder	
II-1	Diese Person ist	<b>nur Anmelder</b>
II-2	Anmelder für	<b>Alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US</b>
II-4	Name	<b>MOLOGEN FORSCHUNGS-, ENTWICKLUNGS- UND VERTRIEBS GMBH</b>
II-5	Anschrift:	<b>30, Fabeckstrasse D-14195 Berlin Deutschland</b>
II-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	<b>DE</b>
II-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	<b>DE</b>
III-1	Anmelder und/oder Erfinder	
III-1-1	Diese Person ist	<b>Anmelder und Erfinder</b>
III-1-2	Anmelder für	<b>Nur US</b>
III-1-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	<b>WITTIG, Burghardt</b>
III-1-5	Anschrift:	<b>33, Salzachstrasse D-14129 Berlin Deutschland</b>
III-1-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	<b>DE</b>
III-1-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	<b>DE</b>

## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.02.2002 07:18:23 PM

III-2	Anmelder und/oder Erfinder	
III-2-1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-2-2	Anmelder für	Nur US
III-2-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	STEIN, Christoph
III-2-5	Anschrift:	Kufsteiner Strasse 14 D-10825 Berlin Deutschland
III-2-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III-2-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III-3	Anmelder und/oder Erfinder	
III-3-1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-3-2	Anmelder für	Nur US
III-3-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	SCHÄFER, Michael
III-3-5	Anschrift:	Carstenstrasse 47a D-12205 Berlin Deutschland
III-3-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III-3-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III-4	Anmelder und/oder Erfinder	
III-4-1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-4-2	Anmelder für	Nur US
III-4-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	SCHROFF, Matthias
III-4-5	Anschrift:	Friedbergstrasse 5 D-14057 Berlin Deutschland
III-4-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III-4-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE
III-5	Anmelder und/oder Erfinder	
III-5-1	Diese Person ist	Anmelder und Erfinder
III-5-2	Anmelder für	Nur US
III-5-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	JUNGHANS, Claas
III-5-5	Anschrift:	Oldenburger Strasse 37 D-10551 Berlin Deutschland
III-5-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	DE
III-5-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	DE

## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.02.2002 07:18:23 PM

III-6	Anmelder und/oder Erfinder	
III-6-1	Diese Person ist	
III-6-2	Anmelder für	
III-6-4	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	
III-6-5	Anschrift:	
III-6-6	Staatsangehörigkeit (Staat)	
III-6-7	Sitz/Wohnsitz (Staat)	
IV-1	Anwalt oder gemeinsamer Vertreter; oder besondere Zustellanschrift Die unten bezeichnete Person ist/wird hiermit bestellt, um den (die) Anmelder vor den internationalen Behörden zu vertreten, und zwar als:	
IV-1-1	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	
IV-1-2	Anschrift:	
IV-1-3	Telefonnr.	
IV-1-4	Telefaxnr.	
IV-1-5	e-mail	
V	Bestimmung von Staaten	
V-1	Regionales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	
<p><b>Anmelder und Erfinder</b>  <b>Nur US</b>  <b>KÖNIG MEREDIZ, Sven, Andres</b>  <b>Portillo de los Ciervos 1</b>  <b>San Sebastian de los Reyes</b>  <b>Madrid</b>  <b>Spanien</b></p> <p><b>DE</b>  <b>ES</b></p> <p><b>Anwalt</b></p> <p><b>BOECKH, Tobias</b>  <b>54/55, Kurfürstendamm</b>  <b>D-10707 Berlin</b>  <b>Deutschland</b>  <b>++49-30-885 929 0</b>  <b>++49-30-885 929 29</b>  <b>boeckh@hertin.de</b></p> <p><b>HERTIN</b>  <b>Anwaltssozietät</b>  <b>Kurfürstendamm 54/55 · 10707 Berlin</b>  <b>Telefon (030) 8859290</b>  <b>Telefax (030) 8859299</b>  <b>Berliner Handels- u. Frankfurter Bank</b>  <b>Kto.-Nr. 70285127 BLZ 100202 00</b></p> <p><b>AP: GH GM KE LS MW MZ SD SL SZ TZ UG ZM</b>  <b>ZW und jeder weitere Staat, der</b>  <b>Mitgliedstaat des Harare-Protokolls und</b>  <b>Vertragsstaat des PCT ist</b></p> <p><b>EA: AM AZ BY KG KZ MD RU TJ TM und jeder</b>  <b>weitere Staat, der Mitgliedsstaat des</b>  <b>Eurasischen Patentübereinkommens und</b>  <b>Vertragsstaat des PCT ist</b></p> <p><b>EP: AT BE CH&amp;LI CY DE DK ES FI FR GB GR</b>  <b>IE IT LU MC NL PT SE TR und jeder</b>  <b>weitere Staat, der Mitgliedsstaat des</b>  <b>Europäischen Patentübereinkommens und</b>  <b>Vertragsstaat des PCT ist</b></p> <p><b>OA: BF BJ CF CG CI CM GA GN GQ GW ML MR</b>  <b>NE SN TD TG und jeder weitere Staat, der</b>  <b>Mitgliedstaat der OAPI und Vertragsstaat</b>  <b>des PCT ist</b></p>		

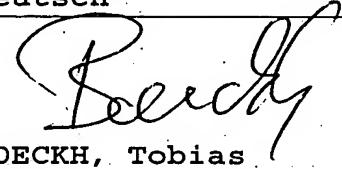
## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.02.2002 07:18:23 PM

V-2	Nationales Patent (andere Schutzrechtsarten oder Verfahren sind ggf. in Klammern nach der (den) betreffenden Bestimmung(en) angegeben)	AE AG AL AM AT AU AZ BA BB BG BR BY BZ CA CH&LI CN CO CR CU CZ DE DK DM DZ EC EE ES FI GB GD GE GH GM HR HU ID IL IN IS JP KE KG KP KR KZ LC LK LR LS LT LU LV MA MD MG MK MN MW MX MZ NO NZ OM PH PL PT RO RU SD SE SG SI SK SL TJ TM TN TR TT TZ UA UG US UZ VN YU ZA ZM ZW
V-5	Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen  Zusätzlich zu den unter Punkten V-1, V-2 und V-3 vorgenommenen Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der nachstehend unter Punkt V-6 angegebenen Staaten. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt.	
V-6	Staaten, die von der Erklärung über vorsorgliche Bestimmungen ausgenommen werden	KEINE
VI-1	Priorität einer früheren nationalen Anmeldung beansprucht	
VI-1-1	Anmeldedatum	24 Februar 2001 (24.02.2001)
VI-1-2	Nummer	10109092.7
VI-1-3	Staat	DE
VI-2	Ersuchen um Erstellung eines Prioritätsbeleges  Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der in der (den) nachstehend genannten Zeile(n) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln:	VI-1
VII-1	Gewählte Internationale Recherchenbehörde	Europäisches Patentamt (EPA) (ISA/EP)
VIII	Erklärungen	Anzahl der Erklärungen
VIII-1	Erklärung hinsichtlich der Identität des Erfinders	-
VIII-2	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, ein Patent zu beantragen und zu erhalten	-
VIII-3	Erklärung hinsichtlich der Berechtigung des Anmelders, zum Zeitpunkt des internationalen Anmeldedatums, die Priorität einer früheren Anmeldung zu beanspruchen	-
VIII-4	Erfindererklärung (nur im Hinblick auf die Bestimmung der Vereinigten Staaten von Amerika)	-
VIII-5	Erklärung hinsichtlich unschädlicher Offenbarungen oder Ausnahmen von der Neuheitsschädlichkeit	-

## PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.02.2002 07:18:23 PM

IX	Kontrollliste	Anzahl der Blätter	Elektronische Datei(en) beigefügt
IX-1	Antrag (inklusive Erklärungsblätter)	6	-
IX-2	Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil)	15	-
IX-3	Ansprüche	3 4	-
IX-4	Zusammenfassung	1	EZABST00.TXT
IX-5	Zeichnung(en)	7	-
IX-7a	Teilanzahl an Blättern	32 33	-
IX-6	Sequenzprotokollteil der Beschreibung	7	-
IX-7	INSGESAMT	39 40	-
IX-8	Beigefügte Unterlagen	Unterlage(n) in Papierform beigefügt	Elektronische Datei(en) beigefügt
IX-16	Blatt für die Gebührenberechnung	✓	-
IX-16 (i)	Sequenzprotokoll in computerlesbarer Form:		
IX-16 (ii)	Kopie ausschließlich für die Zwecke der internationalen Recherche nach Regel 13ter (und nicht als Teil der internationalen Anmeldung)	-	1 Diskette
IX-17	PCT-EASY-Diskette	-	Diskette
IX-19	Nr. der Abb. der Zeichn., die mit der Zusammenf. veröffentlicht werden soll		
IX-20	Sprache der int. Anmeldung	Deutsch	
X-1	Unterschrift des Anmelders, des Anwalts oder des Gemeinsamen Vertreters		HERTIN Anwaltssozietät Kurfürstendamm 54/55 10707 Berlin Telefon (030) 8859290 Telefax (030) 88592929 Berliner Handels- u. Frankfurter Bank Kto.-Nr. 70285127 BLZ 100202 00
X-1-1	Name (FAMILIENNAME, Vorname)	BOECKH, Tobias	

## VOM ANMELDEAMT AUSZUFÜLLEN

10-1	Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung	19. Feb. 2002 (19.02.02)
10-2	Zeichnung(en):	
10-2-1	Eingegangen	
10-2-2	Nicht eingegangen	
10-3	Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingeg. Unterlage(n) oder Zeichnung(en) zur Vervollständigung dieser int. Anmeldung	
10-4	Datum des fristgerechten Eingangs der Berichtigung nach PCT Artikel 11(2)	
10-5	Internationale Recherchenbehörde	ISA/EP
10-6	Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben	

PCT-ANTRAG

Original (für EINREICHUNG) - gedruckt am 15.02.2002 07:18:23 PM

VOM INTERNATIONALEN BÜRO AUSZUFÜLLEN

11-1	Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro
------	---

## **Mittel zur lokalen Schmerzbekämpfung**

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Dämpfung der Schmerzempfindung, insbesondere bei akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen, durch Expression körpereigener neuroendokriner Peptide an der Entzündungsstelle.

### **Allgemeiner Hintergrund der Erfindung**

- 5 Schmerz ist ein Signal des Körpers, das Krankheit oder Verletzung anzeigt. Als solches ist es, obwohl subjektiv als unangenehm empfunden, sinnvoll und wichtig. Wenn Schmerz chronisch wird, tritt seine Warnfunktion in den Hintergrund. Chronischer Schmerz ist ein medizinisch und sozio-ökonomisch schwerwiegendes Problem. In Deutschland allein leben 700.000 bis 800.000 Schmerzkranke, von
- 10 denen nur 10% adäquat behandelt werden können. Zu den wichtigsten Verursachern von Schmerzerkrankungen gehören die Gruppe der rheumatischen Erkrankungen, Krebsleiden sowie Schmerzen unklarer Ursache wie Rücken- und Kopfschmerzleiden ohne feststellbare organische Ursache. Allein rheumatische Schmerzleiden verursachen in Deutschland jährlich Kosten von rund 30 Milliarden
- 15 Mark. In den USA leiden zur Zeit ca. 40 Millionen Menschen an Arthritis, für 2020 ist eine Fallzahl von fast 60 Millionen geschätzt worden (J Managed Care Pharm 1999: 414-419).

- 20 Neben die Behandlung der den chronischen Schmerz verursachenden grundlegenden Leiden (welche in vielen Fällen an einem mangelnden Verständnis der pathogenen Mechanismen oder einem Fehlen an therapeutischen Interventionsmöglichkeiten scheitert) tritt die Notwendigkeit, den Schmerz wirkungsvoll zu bekämpfen. Die beiden Substanzklassen, die hier vor allem

eingesetzt werden, sind die der Opiate und der sog. nicht-steroidalalen Entzündungshemmer (Nonsteroidal antiinflammatoy drugs, NSAIDs).

Beide Substanzklassen sind in ihrer Anwendung nicht unproblematisch, wegen des tatsächlichen oder subjektiv befürchteten Suchtpotentials, der möglichen

5      Atemdepression, Übelkeit und Sedierung (Opiate) oder der z.T. dramatischen Nebenwirkungen vor allem im gastrointestinalen Bereich (Ulcus, Blutungen (NSAIDs)). Zusätzlich zu den durch den chronischen Schmerz verursachten Beschwerden besteht für die mit NSAIDs behandelten Patienten eine erheblich erhöhte Wahrscheinlichkeit, an gastrointestinalen Beschwerden als Folge der

10     Therapie zu leiden.

Das Bedürfnis nach lokal (am Ort der Schmerzentstehung) wirksamen Mitteln ohne die genannten zentralnervösen oder gastrointestinalen Nebenwirkungen zur Schmerzbekämpfung ist mithin offensichtlich.

#### **Wissenschaftliche Vorarbeiten**

15     Seit ca. 1990 ist bekannt, dass Opioidrezeptoren in der Peripherie zur Schmerzdämpfung (Antinociception) in entzündetem Gewebe beitragen, und dass die wirksame Komponente der Antinociception körpereigenes  $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -END) ist (Stein et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87, 5935-5939 (1990)). Der Effekt ist im Modell der entzündeten Rattenpfote auf entzündetes Gewebe beschränkt (Stein et

20     al. J. Neuroscience 10, 1292-1298 (1990)). Das  $\beta$ -END wird im entzündeten Gewebe von Lymphozyten produziert und freigesetzt (Cabot et al. J. Clin. Invest. 100, 142-148 (1997)).

Die lokale Freisetzung von Corticotropin-Releasing Factor (CRF) ist dabei Voraussetzung des schmerzdämpfenden Effektes des  $\beta$ -END, und für Interleukin-25     1 $\beta$  konnte eine den antinociceptiven Effekt fördernde Funktion gezeigt werden (Schäfer et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91, 4219-4223; ibid. 93, 6096-6100 (1996)). Die antinociceptive Wirkung der Leukozyten bedarf der Einwanderung der  $\beta$ -END sezernierenden Zellen in das entzündete Gewebe (Machelska et al, Nature

Medicine 4, 1425-1428 (1998)). Der Stand der Forschung ist referiert in Machelska und Stein, Current Opinion in Anaesthesiology 1999, 579-581.

Ishii et al. (Experimental Neurology 166, 90-98 (2000)) konnten zeigen, dass die Implantation von  $\beta$ -END produzierenden Tumorzelllinien in den Subarachoidalraum 5 zur Schmerzdämpfung im Tiermodell führt. Ähnliche Ergebnisse zeigen Wu et al. (Neural Transplant Plast 4, 15-26 (1993)). Es ist dabei zu bemerken, dass diese Untersuchungen nicht an Tieren mit akut entzündetem Gewebe durchgeführt wurden, und die Implantation von genetisch modifizierten Tumorzellen ins zentrale Nervensystem eine relativ grosse Ferne von in Menschen anwendbaren 10 Problemlösungen erkennen lässt.

Feingold und Iadarola (Hum Gene Therapy 10(7):1251-7 (1999)) zeigten die antinociceptive Wirkung von  $\beta$ -END, welches von genetisch modifizierten Adenoviren sezerniert wird, die in den Subarachnoidalraum gespritzt wurden und die Meningen infizierten. Diese Methodik wurde von Iadarola et al. ebenfalls zum 15 Patent angemeldet (WO 0016800 A2). Eine virale Methode des Gentransfers beschreiben Wilson et al. (Proc Natl Acad Sci U S A 96, 3211-6 (1999); Brain Res 792, 133-5 (1998)), die Herpesviren als Genfähre in Gewebe des Zentralen Nervensystems einsetzen.

$\beta$ -END ist ein 31 Aminosäuren langes Peptid. Es ist kodiert auf dem Exon 3 des 20 Pro-Opiomelanocortingens (POMC) und wird als Teil eines Vorläuferpeptides gebildet, aus dem auch die Peptidhormone ACTH und gamma-Lipotropin erhalten werden. Die Transkriptlänge des POMC ist unterschiedlich für zentrale und peripherale Gewebe (Grauerholz et al., Peptides 19, 939-948 (1998)).

Es wurde bereits gezeigt (Bauer M. et al., Abstract Sun27, 31th Conference 2000 25 INRC, July 16<sup>th</sup> to July 18<sup>th</sup> 2000, Seattle, Washington USA), Zellkulturzellen mit  $\beta$ Endorphin(END) exprimierenden Konstrukten zu transfizieren und anschließend das Zelllysat dieser transfizierten Zellen in Rattenpfoten zu injizieren. Es wurde also rekombinantes END, verunreinigt mit zellulären Bestandteilen wie Proteinen, Membranfragmenten, Organellen und Nukleinsäuren, in Rattenpfoten injiziert. 30 Dieser Versuch diente dazu, um ganz grundsätzlich festzustellen, ob von den Konstrukten überhaupt exprimierbares END gebildet wird, wenn es in analoger

Verfahrensweise zur biotechnologischen Herstellung rekombinanter Proteins, aber ohne die pharmazeutisch dazugehörende umfangreiche Aufreinigung, in Zellkulturzellen gebildet wird. Dieser Versuch war jedoch nicht dazu geeignet, festzustellen, ob die vom anwendungstechnischen Standpunkt einzig tolerable

5 Verwendung von isolierten Expressionskonstrukten zur Injektion in entzündetes Gewebe einen schmerzlindernden Effekt hat.

Ausgehend von diesem Stand der Wissenschaft ist es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein effektives Mittel zur Verminderung bzw. Unterdrückung der Schmerzempfindung bei Säugern, insbesondere Menschen, zur Verfügung zu

10 stellen.

Gelöst wird diese Aufgabe durch die kennzeichnenden Merkmale des Anspruchs 1.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein Mittel gelöst, welches – unter Ausschluß von Zellen oder Zellsäften – Expressionskonstrukte zur lokalen Expression von neuroendokrinen Peptiden oder funktionellen Teilen derselben 15 beinhaltet. Insbesondere der Verzicht auf Expressionskonstrukte, die zum Zwecke der späteren Vakzinierung / Injizierung in Zellen verbracht wurden oder in Zellsäften enthalten sind, sondern in isolierter Form als "nackte DNA" oder komplexiert mit Polymeren injiziert werden, führt zu überraschenden Erfolgen.

Ein wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht in der Unterdrückung von Schmerz 20 durch die lokale Expression von neuroendokrinen Peptiden. Ein weiterer wesentlicher Aspekt der Erfindung besteht darin, geeignete Expressionskonstrukte zur lokalen Synthese von neuroendokrinen Peptiden, insbesondere  $\beta$ -Endorphin, dessen Vorläufer POMC sowie geeigneter Abwandlungen dieser Peptide, und Corticotropin-releasing-factor zur Verfügung zu stellen.

25 Erfindungsgemäß ist daher ein Mittel zur Verminderung oder Unterdrückung der Schmerzempfindung vorgesehen, welches Expressionskonstrukte zur Expression von neuroendokrinen Peptiden oder funktionellen Teilen derselben enthält, wobei es sich insbesondere um  $\beta$ -Endorphin, dessen Vorläufer Pro-Opiomelanocortingens (POMC) sowie geeigneter Abwandlungen dieser Peptide, und/oder den 30 Corticotropin-releasing-factor (CRF) handelt.

Das Mittel enthält erfindungsgemäß ein Genkonstrukt, welches zumindest den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter), die DNA-Sequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) kodierend für  $\beta$ -Endorphin und eine geeignete Polyadenylierungssequenz enthält.

- 5 Die Expression der POMC-Sequenz in Gewebe führt neben der für die Schmerzdämpfung erwünschten Synthese von  $\beta$ -END auch zur Synthese mindestens der Gewebshormone adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und beta-melanozytenstimulierendes Hormon (beta-MSH). Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass in der weiteren klinischen Entwicklung der hier beschriebenen Erfindung
- 10 sich die Synthese dieser "Nebenprodukte" als nachteilhaft erweist, wurden alternative Expressionskassetten hergestellt, in denen die für ACTH und beta-MSH kodierenden Abschnitte deletiert oder durch  $\beta$ -END kodierende Abschnitte ersetzt wurden (Beispiele 1.3, 1.4 und Abb. 4). Auch diese Expressionskassetten zeigen im RIA die Synthese von  $\beta$ -END. (Abb. 2a und 2 b).
- 15 Insbesondere diejenigen Expressionskassetten, in denen die für ACTH und beta-MSH kodierenden Abschnitte durch  $\beta$ -END kodierende Abschnitte (2x $\beta$ -END bzw. 3x $\beta$ -END) ersetzt wurden, stellen eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung dar, da dieses Expressionsergebnis nicht zu erwarten und daher überraschend ist. Aus der natürlichen POMC-mRNA-Sequenz wird ein Polypeptid translatiert, welches
- 20 von endogenen Proteasen in die wirksamen Peptidhormone gespalten wird. Die Proteasen erkennen dabei "chemisch" den Sequenzkontext der an der Spaltstelle gelegenen Aminosäuren. Es ist insofern sehr überraschend, dass der Austausch der natürlichen Bestandteile des POMC-Gens, welche kein Endorphin kodieren, durch weitere Endorphin-kodierende Bestandteile, zu einer erhöhten Produktion von
- 25 Endorphin durch diese Konstrukte exprimierende Zellen führt. Dies ist insbesondere deshalb überraschend, weil nicht zu erwarten war, dass die im Vergleich zur Originalsequenz geänderte Aminosäurensequenz an den gleichen Stellen zu korrekter Proteaseaktivität führt.

Die erfinderische Leistung liegt daher - unter anderem – hier darin, dass hier eine

- 30 „Austauschklonierung“ vorgenommen wurde, indem die ohnehin in der Sequenz des natürlichen Leserahmens der POMC-Sequenz mehrfach hintereinander

angeordneten Sequenzabschnitte ( $\beta$ -END – ACTH – beta-MSH) durch mehrfache  $\beta$ -END Sequenzabschnitte ersetzt bzw. ausgetauscht wurden (ACTH >  $\beta$ -END und beta-MSH >  $\beta$ -END), so dass im Ergebnis innerhalb der natürlichen POMC-Sequenz dann die Sequenzabschnitte für  $\beta$ -END –  $\beta$ -END –  $\beta$ -END einander 5 folgen und auch exprimiert werden. Die Erfindung macht sich daher die natürliche Sequenz zunutze.

Erfindungsgemäß ist daher auch Gegenstand der Anmeldung eine Desoxyribonukleinsäuresequenz, enthaltend zwei der für  $\beta$ -Endorphin kodierenden Sequenzabschnitte des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), nämlich die in Seq.ID 7 10 (rPOMC 2x $\beta$ -END) und im folgenden wiedergegebene Sequenz.

atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct gtttcagacc 60  
tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct caccacggaa 120  
agcaacctgc tggcttgcatt cccggcctgc agactcgacc tctcggcggaa gacgcccgtg 180  
tttccaggca acggagatga acagcccttg actgaaaatc cccggaagta cgtcatgggt 240  
15 cacttccgct gggaccgctt cggcccgaga aacagcagca gtgctggcgg ctcagcgcag 300  
aggcgtgcgg aggaagagac ggcgggggaa gatggccgtc cggagccaag tccacgggag 360  
ggcaagcgtt acggcggctt catgacccctcc gagaagagcc agacccccctt ggtgacgctc 420  
ttcaagaacg ccatcatcaa gaacgtgcac aagaaggggcc agaagcgcta cggcggcttc 480  
20 atgacccctcg agaagagcca gacgcccctg gtgacgctct tcaagaacgc catcatcaag 540  
aacgtgcaca agaaggggcca gtga 564

Erfindungsgemäß ist aber auch Gegenstand der Anmeldung eine Desoxyribonukleinsäuresequenz, enthaltend drei der für  $\beta$ -Endorphin kodierenden Sequenzabschnitte des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), nämlich die in Seq.ID 2 (rPOMC 3x $\beta$ -END) und im folgenden wiedergegebene Sequenz.

25 atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct gtttcagacc 60  
tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct caccacggaa 120  
agcaacctgc tggcttgcatt cccggcctgc agactcgacc tctcggcggaa gacgcccgtg 180  
tttccaggca acggagatga acagcccttg actgaaaatc cccggaagta cgtcatgggt 240  
cacttccgct gggaccgctt cggcccgaga aacagcagca gtgctggcgg ctcagcgcag 300  
15 30 aggcgtgcgg aggaagagac ggcgggggaa gatggccgtc cggagccaag tccacgggag 360  
ggcaagcgtt acggcggctt catgacccctcc gagaagagcc agacccccctt ggtgacgctc 420  
ttcaagaacg ccatcatcaa gaacgtgcac aagaaggggcc agaagcgcta cggcggcttc 480  
atgacccctcg agaagagcca gacgcccctg gtgacgctct tcaagaacgc catcatcaag 540  
35 aacgtgcaca agaaggggcca gaagcgctac ggcggcttca tgacccctcg gaagagccag 600  
acgcccctgg tgacgcttca aagaacgca acgtgcacaa gaagaggccag 660

tga

663

Erfindungsgemäß ist ferner auch Gegenstand der Anmeldung eine humane Desoxyribonukleinsäuresequenz, enthaltend den für  $\beta$ -Endorphin kodierenden

Sequenzabschnitt des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), nämlich die in Seq.ID 8 (human POMC) und im folgenden wiedergegebene Sequenz.

5 atgcccagat cgtgctgcag ccgctcgaaa gcccgttgc tggccttgcgt gcttcaggcc 60  
tccatggaaag tgcgtggctg gtgcctggag aacagccagt gtcaggaccc caccacggaa 120  
agcaaacctgc tgaaggggat gggacaaaag aggccgtggc aagatcttag atgcccacga 180  
gtgccaagaa agcaggtggg cagacctgcc ttagggagg cctcgacgct tgacacgc 240  
gacactgtgc cctgtgtcct cggcgagtgc atccgggcct gcaagccga cctctcgccc 300  
gagactccca tggccgggg aaatggcgac gaggcgc tggccggc gcaacagcag cagcagcggc 360  
10 tacgtcatgg gccaattccg ctgggaccga ttccggccgc gcaacagcag cagcagcggc 420  
agcagcggcg cagggcagaa ggcgaggac gtctcagcgg gctcaagactg cggcccgctg 480  
cctgaggcg gccccggcc cccgcggat ggtgccaagc cggcccgccg cgaggcaag 540  
cgctcctact ccatggagca ttccgcgtgg gcaagccgg tggcaagaa gggccggcc 600  
gtgaagggtgt accctaacgg cggcgaggac gatcgccggc aggccctccc cctggagttc 660  
aagagggagc tgactggcca gcaactccgg gaggagatg gccccacgg ccctggccat 720  
15 gacggcgac gggcccgaggc cgacctggag cacagcctgc tggccggc gagaagaag 780  
gacgaggcgcc cctacaggat ggagcacttc cgctggggca gcccggccaa gacaagcgc 840  
tacggcggtt tcatgaccc cggaaagagc cagacggccc tggcagcgt gttcaaaaac 900  
gccatcatca agaacgccta caagaaggc gagtga 936

Der für  $\beta$ -Endorphin kodierende Sequenzabschnitt des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), weißt die folgende DNA-Sequenz auf (siehe Seq.ID 9):

GGCT TCATGACC TCCGAGAAGA GCCAGACGCC CCTGGTGACG CTCTTCAAGA ACGCCATCAT  
CAAGAACGTG CACAAGAAGG GCCAG

Die humane Sequenz (siehe Seq.ID 10):

GGTT TCATGACC TCCGAGAAGA GCCAGACGCC CCTGGTGACG CTGTTCAAAA ACGCCATCAT  
25 CAAGAACGCC TACAAGAAGG GCGAG

unterscheidet sich in lediglich 6 Basen von der Rattensequenz (unterstrichen).

Ein entsprechendes Expressionskonstrukt für den Corticotropin-releasing-factor (CRF) ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

$\beta$ -Endorphin kann durch Insertion der vollständigen Sequenz des POMC-Gens der 30 Ratte (Seq.ID 3) zwischen den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter) und eine geeignete Polyadenylierungssequenz innerhalb eines Expressionsplasmides (Abb. 1) und nachfolgende Transfektion dieses Expressionsplasmides in Zellkulturzellen der Ratte oder des Menschen im Radioimmunoassay (RIA) nachgewiesen werden (Abb. 2a und 2b). Eine zur 35 Kontrolle hergestellte Expressionskassette, in der vor der das  $\beta$ -END kodierenden

Nukleinsäuresequenz ein Stop-Kodon eingeführt wurde, zeigt keine Expression von  $\beta$ -END im RIA (Abb. 3, rechter Balken).

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Vektoren zur Herstellung der Expressionskonstrukte. Dabei wurden die Plasmide pMOK und pNOK verwendet,

5        welche die DNA-Sequenzen bzw. den Sequenzabschnitt für  $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -END) in unterschiedlichen Variationen, nämlich mehrfach, enthält, aber auch die Sequenz für den Corticotropin-releasing-factor (CRF) enthielten. Das rPOMC ist ein Polyprotein, aus dem durch Abspaltung durch zelleigene Proteininasen die eigentlichen Peptidhormone ( $\beta$ -MSH, ACTH,  $\beta$ Endorphin) herausgespalten werden.

10      Durch Ersatz der Sequenzen von  $\beta$ MSH und ACTH durch  $\beta$ -Endorphin erhofft man sich eine höhere Expression des  $\beta$ -END und dadurch eine verstärkte Schmerzreduktion. Die mehrfache Nutzung des Sequenzabschnittes für  $\beta$ -Endorphin hat den Sinn, dass verstärkt  $\beta$ -Endorphin abgelesen und exprimiert wird (siehe oben).

15      Es wurden verschiedene Expressionskonstrukte aus dem Plasmid pMOK-POMC hergestellt. Die Einzelheiten der Herstellung sind in den der EP 0 941 318 B1 und DE 198 26 758 offenbart. Im Einzelnen wurden Plasmid-DNA, linear-kovalent geschlossene unmodifizierte (sogenannte "MIDGE"-) Expressionskonstrukte sowie mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40

20      enthaltenden Peptid modifizierte MIDGE-Konstrukte hergestellt (MIDGE-NLS) (Abb. 4). Diese Modifikation zeigt den überraschende Vorteil, dass derart modifizierte Konstrukte die Transfektionseffizienz verstärken. Die NLS-Kopplung der minimalistischen Nukleinsäurekonstrukte führt zu einer deutlichen Erhöhung der Effizienz des Gen-Transfers und damit der Expression von  $\beta$ -END. Diese

25      Expressionssteigerung wird dadurch erreicht, dass an das zu exprimierende Gen Oligodesoxyribonukleotide ligiert werden, an die zuvor ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) kovalent gebunden wurde. Wie aus *in vitro*-Versuchen bekannt ist, kann diese aus dem Virus SV40 stammende Sequenz den Transport von DNA aus dem Cytosol der Zelle in den Zellkern verbessern und somit die

30      Transkriptionsrate der DNA steigern (vgl. WO 00/37659).

Es sind aber gleichsam auch grundsätzlich peptide bevorzugt, die mit den linear-kovalent geschlossenen Expressionskonstrukten konjugiert sind. Bevorzugt sind dabei kathionische Peptide mit einer aus 8 bis 20 Aminosäuren bestehenden Länge.

Bereits die Injektion von Plasmiden, welche die Expressionskassette für POMC 5 enthalten, in entzündete Rattenpfoten, führt zu einer deutlichen Abnahme des Schmerzempfindens bei den behandelten Tieren (siehe Abb. 3). Diese Wirkung ist durch Komplexierung der DNA durch Polyethylenimin (PEI) noch deutlich verstärkbar (Abb. 5). Durch Komplexierung der DNA mit positiv geladenen Makromolekülen wird die Aufnahme von DNA in die Zelle erleichtert, zum anderen 10 wird eine Art Kerntransportfunktion angenommen (Chemin I. et al., J. Viral Hepat, Nov; 5 (6): 369-75, 1998).

Die Injektion von POMC-kodierendem MIDGE führt ebenfalls zu einer signifikanten 15 Reduktion des Schmerzempfindens. Die Injektion von peptidmodifizierten Konstrukten (MIDGE-NLS) allerdings hat mit grossem Abstand die höchste Wirkung (Abb.6).

Folgerichtig wird auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels, enthaltend die erfindungsgemäßen Expressionskonstrukte als Arzneimittel, insbesondere als Vakzine beansprucht.

Die Erfindung weißt insbesondere folgende Vorteile auf: Durch das 20 erfindungsgemäße Mittel wird eine Behandlung von chronischen Schmerzleiden ermöglicht, bei der auf den Einsatz von Opiaten und der nicht-steroidalen Entzündungshemmern (Nonsteroidal antiinflammatories, NSAIDs) verzichtet werden kann. Die mit derartigen Mitteln auftretenden bekannten Nebenwirkungen wie Übelkeit, Atemdepression, Abhängigkeit und Suchtprobleme (bei Opiaten), 25 Magengeschwüre etc. können mithin vermieden werden. Ferner weißt das erfindungsgemäße Mittel den überraschende Vorteil auf, daß es länger anhaltend ist, nämlich im Bereich von Tagen als bei der Injektion von rekombinanten  $\beta$ -END (Wirkungsdauer im Bereich von Minuten).

Die vorliegende Erfindung schafft mithin ein Mittel zur Schmerzunterdrückung, 30 wobei – im Gegensatz zu Bauer M. et al. (Abstract Sun27, 31th Conference 2000

INRC, July 16<sup>th</sup> to July 18<sup>th</sup> 2000, Seattle, Washington USA) – keine Transfizierung von DNA-Expressionskonstrukten in Zellkulturzellen und die nachfolgende Verwendung der rohen Proteinsuspension, sondern eine Injektion von exprimierbaren Konstrukten direkt in das entzündete Gewebe zur

5 Schmerzunterdrückung stattfindet. Genau dieser Effekt konnte von Bauer et. al. nicht gezeigt werden. Es werden also keine transfizierten Zellen oder Zellysate als Bestandteil des erfindungsgemäßen Mittels bzw. der daraus resultierenden Vakzine verwendet. Die Vermeidung der Zellysate führt zu überraschenden Erfolgen, wie im folgenden näher noch ausgeführt wird. Überraschenderweise war der Effekt mit

10 MIDGE noch besser als mit Plasmid, und noch viel besser mit den MIDGE-NLS-Konstrukten. Dieser Effekt insbesondere wird bei der Verwendung von Zellysaten nicht beobachtet.

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen beschrieben; die Erfindung wird anhand von Ausführungsbeispielen und den nachfolgenden

15 Abbildungen näher beschrieben:

**Abb. 1** zeigt den funktionellen Aufbau der verwendeten Expressionsplasmide pMOK und pNOK sowie die klonierten rPOMC-Sequenzen. Die künstlichen Sequenzen rPOMC-1 $\beta$ End, rPOMC-2 $\beta$ End und rPOMC-3 $\beta$ End wurden in das Plasmid pNOK kloniert, das einen einfachen CMV Promotor und kein Intron besitzt.

20 **Abb. 2** zeigt den Nachweis der Expression von  $\beta$ -END im Zellysat von Rattenzellkulturen mittels eines Radioimmunoassays (RIA). Alle Expressionskonstrukte zeigten eine deutliche Expression von  $\beta$ END. Auch dieses Ergebnis der erhöhten Expression mit den künstlichen Konstrukten war nicht zu erwarten und steht in Gegensatz zu Bauer M. et al. (Abstract Sun27, 31th Conference 2000 INRC, July 16<sup>th</sup> to July 18<sup>th</sup> 2000, Seattle, Washington USA), wo lediglich das natürlich vorkommende POMC verwendet wurde. Dabei zeigen die Ergebnisse, dass Exprimierung nach Klonierung in den pMOK-Vektor (**Abb. 2b**) effektiver ist als wenn in den pNOK-Vektor kloniert wird (**Abb. 2a**).

**Abb. 3** zeigt die lineare Korrelation zwischen der applizierten Menge des

30 Plasmids pMOK-rPOMC und der Schmerzempfindungsschwelle der Versuchstiere. Als Plasmidinsert wurde die vollständige rPOMC Sequenz (Bsp: 1.1) benutzt und

das Plasmid in verschiedenen Konzentrationen in die Entzündungsstelle injiziert. Zum Nachweis der schmerzlindernden Wirkung von  $\beta$ -END, wurde eine um die Sequenz von  $\beta$ -END verkürzte Expressionskassette (Bsp. 1.2) hergestellt. Erwartungsgemäß zeigt sich keine schmerzlindernde Wirkung im Versuch, siehe 5 rechten äußenen Balken in Abb. 3.

Abb. 4 zeigt die verschiedenen Expressionskassetten, die zur Herstellung der MIDGE Konstrukte verwendet wurden. Die erzeugten Konstrukte enthalten neben der kodierenden Sequenz lediglich die zu ihrer Expression notwendigen Promotor- und Terminationssequenzen. Die Kopplung mit den Peptiden zur 10 nukleären Lokalisation (NLS-Sequenz) erfolgte wahlweise.

Abb. 5 zeigt ist die signifikante Verstärkung der Expression von  $\beta$ -END durch Komplexierung der DNA mit PEI bei Plasmid.

Abb. 6 zeigt den Vergleich der antinociceptiven Wirkung der eingesetzten Expressionkonstrukte Plasmid, MIDGE und MIDGE mit NLS gekoppelt (MIDGE-NLS). Dabei zeigt sich MIDGE-NLS als mit großem Abstand effektivstes 15 Expressionssystem.

Abb. 7 zeigt die antinociceptive Wirkung der peptidmodifizierten MIDGES in Abhängigkeit von der Zeit. Ein signifikanter Effekt der Schmerzlinderung ist selbst nach 96 Stunden bei applizierten Konzentrationen von MIDGE-rPOMC-NLS von 50 20 und 125  $\mu$ g zu sehen.

### Ausführungsbeispiele

#### Beispiel 1.1: Klonierung von rPOMC der Ratte

RNA wurde aus Rattenhirn-Zellen isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase mit universellen Primern in DNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für die 25 cDNA des POMC (linker Primer: 5'-AATTATGGTACCATGCCGAGATTCTGCTACAG; rechter Primer: 5'-TTCTCAGAGCTCTCACTGGCCCTTGTGCACGTTCTGATG) wurde eine PCR durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt erwarteter Länge wurde

aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen KpnI und SacI verdaut und in den Vektor pMOK kloniert. Klone wurden mit Restriktionsverdauen analysiert und Klone richtiger Fragmentlängen durch Sequenzierung bestätigt. Die Wildtyp-Sequenz ist in Seq.ID 3 (rPOMC-WT) wiedergegeben.

5 Beispiel 1.2: Klonierung von rPOMC-β-END

Als Templat für die Klonierung des POMC-β-END diente das Plasmid pMOK-rPOMC. Durch PCR wurde ein Fragment amplifiziert, das im Vergleich zur POMC Sequenz um die kodierende Sequenz für das β-END verkürzt war. Das Stop-Codon für die neu entstandene verkürzte Sequenz wurde durch die PCR neu eingeführt  
10 (das Stop-Codon ist im rechten Primer fett markiert). Folgende Primer wurden in der PCR verwendet:

linker Primer:

5'-AATTATGGTACCATGCCGAGATTCTGCTACAG

rechter Primer:

15 5'-ATTATGAGCTCT**CAGCGCTTGT**CCTGGGCGGGTTG

Nach Aufreinigen des PCR-Produktes und Restriktionsverdau mit KpnI und SacI wurde das Fragment in den Vektor pMOK kloniert. Klone wurden mit Restriktionsverdauen analysiert und Klone richtiger Fragmentlängen durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz ist in Seq.ID 4 (rPOMC-β-END)  
20 wiedergegeben.

Beispiel 1.3: Klonierung von rPOMC 1xβ-END

Als Template für die Klonierung des POMC 1xβEND diente das Plasmid pMOK-rPOMC. Das künstliche Genkonstrukt setzt sich zusammen aus den Nukleotiden der POMC-Sequenz bis zum letzten Codon vor dem Start der ACTH-Sequenz und der  
25 β-END-Sequenz. Zum Zusammensetzen der Gensequenz waren zwei PCR-Reaktionen nötig. Folgende Primer wurden verwendet:

Fragment 1:

linker Primer:

5'-AATTATGGTACCATGCCGAGATTCTGCTACAG

rechter Primer:

5'-ATTATTGAGCTCTAGAAGACATGCGCTGCCCTCCGTGGA

Fragment 2:

linker Primer:

5 5'-AATTATGGTCTCTGCGCTACGGCGGCTTCATGACCTC

rechter Primer:

5'-AATTATGAGCTCTGAAGACATGCGCTCTGGCCCTTGTGCACGTT

Nach Amplifikation des ersten Fragmentes mit PCR und anschließender Aufreinigung wurde das Fragment mit KpnI und SacI geschnitten und in den Vektor pMOK kloniert. Richtig Klonen wurden mit Restriktionsverdauen gefunden und mit Sequenzierung bestätigt. Das resultierende Plasmid wurde mit BbsI und SacI geschnitten. Fragment 2 wurde nach Aufreinigung mit Eco31I und SacI geschnitten. Die Überhänge, die von BbsI und Eco31I generiert wurden, sind komplementär zueinander. Das Fragment 2 wurde in den Vektor mit Fragment 1 kloniert und richtige Klonen mit Restriktionsverdauen gefunden und mit Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz ist in Seq.ID 1 (rPOMC 1x $\beta$ -END) wiedergegeben.

#### Beispiel 1.4: Klonierung von rPOMC 3x $\beta$ -END

Als Template für die Klonierung des POMC 3x $\beta$ -END diente ebenfalls das rPOMC.

Im Vergleich zu Beispiel 1.3 musste eine weiteres Fragment durch Amplifikation mit

20 PCR hergestellt werden (Fragment 3). Im Unterschied zu Fragment 2 aus Beispiel 1.3 enthielt die Sequenz des Fragmentes 3 kein Stopcodon am Ende der  $\beta$ -END-Sequenz. Das Zwischenprodukt und das Fragment 2 aus Beispiel 1.3 konnten hier verwendet werden. Folgende Primer wurden für die Amplifikation von Fragment 3 verwendet:

25 Fragment 3:

linker Primer:

5'-AATTATGGTCTCTGCGCTACGGCGGCTTCATGACCTC

rechter Primer:

5'-TTCTCAGAGCTCTCACTGGCCCTTGTGCACGTTCTGATG.

30 Nach Aufreinigung wurde das Fragment 3 mit Eco31I und SacI geschnitten und in das mit BbsI und SacI geschnittene Zwischenprodukt kloniert. Das entstandene Zwischenprodukt 2 wurde ebenfalls mit BbsI und SacI geschnitten und ein weiteres

Mal wurde das Fragment 3 in das Zwischenprodukt 2 kloniert. Zwischenprodukt 3 wurde noch einmal mit BbsI und SacI geschnitten und das Fragment 2 aus Beispiel 1.3 wurde als letztes Fragment (dieses Fragment enthält das Stop-Codon) in das Zwischenprodukt 3 kloniert. Das entstandene Plasmid enthielt 3  $\beta$ -END Sequenzen  
5 hintereinander. Die Sequenz ist in Seq.ID 2 (rPOMC 3x $\beta$ -END) wiedergegeben.

Beispiel 1.5: Klonierung von rPOMC-CRF

RNA aus Rattenhirn-Zellen wurde isoliert und mit Hilfe der reversen Transkriptase mit universellen Primern wurde die RNA in DNA umgeschrieben. Mit spezifischen Primern für die cDNA des Corticotropin-releasing-factor ((CRF); linker Primer: 5'-  
10 TTAATAGGTACCATGCGGCTGCGGCTGCTG; rechter Primer: 5'-ATTATGAGCTCTCATTCCCGATAATCTCCATC) wurde eine PCR durchgeführt. Das entstandene PCR-Produkt erwarteter Länge wurde aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen KpnI und SacI verdaut und in den Vektor pMOK kloniert. Klone wurden mit Restriktionsverdauen analysiert und Klone richtiger Fragmentlängen  
15 durch Sequenzierung bestätigt. Die Sequenz ist in Seq.ID 6 (rPOMC-CRF) wiedergegeben.

Beispiel 1.6: Herstellung von MIDGE-rPOMC mit und ohne NLS

MIDGES sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer  
20 Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOK-rPOMC wurde mit Eco 31I vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-AGGGGTCCAG-  
25 TTTTCTGGAC-3' durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 31I wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 31I und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

MIDGES mit NLS Kopplung wurden wie folgt konstruiert: das NLS Peptid PKKKRKVEDPYC wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde  
30 das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-d(GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC, wobei xT

steht für amminomodifizierte Thyminbase mit C<sub>2</sub> – Amminolinker) (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE-  
10 POMC-NLS Konstrukte wie zuvor beschrieben verwendet.

Beispiel 2.1: Schmerzdämpfung nach Injektion von Expressionskonstrukten für rPOMC

50, 100, 250 und 350 µg pMOK-rPOMC wurden in 150mM Natriumphosphat pH 7,2 in einem Volumen von 200 µl in eine entzündete Rattenpfote injiziert. 24 h später  
15 wurde die Schmerzdämpfung in der entzündeten Rattenpfote untersucht. Die dabei verwendete Methode des „paw pressure threshold“ ist u.a. in Schaefer et al., Proc. Nat. Acad. Sci USA 914219-4223 (1994) auf Seite 4220 im Methodenteil beschrieben. Abb. 3 zeigt die Ergebnisse des Versuches. Pro Gruppe wurden 6 Ratten verwendet.

### Patentansprüche

1. Mittel zur Verminderung oder Unterdrückung der Schmerzempfindung bei höheren Tieren, insbesondere Menschen, enthaltend – unter Ausschluß von Zellen oder Zellysaten – Expressionskonstrukte zur lokalen Expression von neuroendokrinen Peptiden oder funktionellen Teilen derselben.  
5
2. Mittel nach Anspruch 1, wobei es sich bei dem neuroendokrinen Peptid um  $\beta$ -Endorphin, dessen Vorläufer Pro-Opiomelanocortingens (POMC) sowie geeigneter Abwandlungen dieser Peptide, und/oder Corticotropin-releasing-factor (CRF) handelt.  
10
3. Mittel nach Anspruch 1 oder 2, wobei dieses ein Expressionskonstrukt enthält, welches zumindest den immediate-early Promotor des Cytomegalievirus (CMV-Promoter), die DNA-Sequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) kodierend für  $\beta$ -Endorphin und eine geeignete Polyadenylierungssequenz enthält.  
15
4. Mittel nach Anspruch 3, wobei aus der POMC-Sequenz die kodierenden Abschnitte für die Gewebshormone adrenocorticotropes Hormon (ACTH) und/oder beta-melanozytenstimulierendes Hormon (beta-MSH) deletiert wurden.  
20
5. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 4, wobei es sich bei dem Expressionskonstrukt um Plasmid-DNA handelt.  
25
6. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 3 bis 4, wobei es sich um ein linear-kovalent geschlossenes Expressionskonstrukt handelt.
7. Mittel nach Anspruch 6, wobei das linear-kovalent geschlossene Expressionskonstrukt mit einem Peptid konjugiert ist.

8. Mittel nach Anspruch 7, wobei das linear-kovalent geschlossene Expressionskonstrukt mit einem die Kernlokalisationssequenz (NLS) des large T-Antigens von SV40 enthaltenden Peptid modifiziert ist.

5 9. Mittel nach Anspruch 8, wobei das NLS-Peptid die Aminosäuresequenz PKKKRKVEDPYC aufweist.

10 10. Mittel nach Anspruch 6, wobei das linear-kovalent geschlossene Expressionskonstrukt mit einem kathionischen Peptid der Länge aus 8 bis 20 Aminosäuren konjugiert ist.

10 11. Mittel nach einem oder mehreren der Ansprüche 5 bis 10, wobei die DNA durch Polyethylenimin (PEI) komplexiert ist.

12. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstrukt des nach den Ansprüchen 1 bis 11, enthaltend die um den Sequenzabschnitt für  $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -END) verkürzte Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC) (rPOMC- $\beta$ -END: Seq.ID 4).

15 13. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstrukt des nach den Ansprüchen 1 bis 11, enthaltend die um die Sequenzabschnitte für ACTH und beta-MSH verkürzte Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), jedoch enthaltend einen einfache für  $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -END) kodierenden Sequenzabschnitt (rPOMC 1x $\beta$ -END: Seq.ID 1).

20 14. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstrukt des nach den Ansprüchen 1 bis 11, enthaltend die um die Sequenzabschnitte für ACTH und beta-MSH verkürzte Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), jedoch mit zwei hintereinander angeordneten für  $\beta$ -Endorphin ( $\beta$ -END) kodierenden Sequenzabschnitten (rPOMC 2x $\beta$ -END).

25

5            15. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstruktes nach den Ansprüchen 1 bis 11, enthaltend die um die Sequenzabschnitte für ACTH und beta-MSH verkürzte Desoxyribonukleinsäuresequenz des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), jedoch mit drei hintereinander angeordneten für β-Endorphin (β-END) kodierenden Sequenzabschnitten (rPOMC 3xβ-END: Seq.ID 2).

10            16. Vektor zur Herstellung eines Expressionskonstruktes nach den Ansprüchen 1 bis 11, enthaltend die Desoxyribonukleinsäuresequenz kodierend für Corticotropin-releasing-factor (CRF) (POMC-CRF: Seq.ID 6).

15            17. Vektor nach Anspruch 12 bis 16, wobei der besagte Vektor das Plasmid pMOC ist.

20            18. Vektor nach Anspruch 12 bis 16, wobei der besagte Vektor das Plasmid pNOK ist.

19. Verwendung des Mittels nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 11 als Vakzine.

20            20. Desoxyribonukleinsäuresequenz, enthaltend zwei der für β-Endorphin kodierenden Sequenzabschnitte des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), nämlich die in Seq.ID 7 (rPOMC 2xβ-END) wiedergegebene Sequenz.

21. Desoxyribonukleinsäuresequenz, enthaltend drei der für β-Endorphin kodierenden Sequenzabschnitte des Pro-Opiomelanocortingens (POMC), nämlich die in Seq.ID 2 (rPOMC 3xβ-END) wiedergegebene Sequenz.

25            22. Humane Desoxyribonukleinsäuresequenz, enthaltend den für β-Endorphin kodierenden Sequenzabschnitt des Pro-

Opiomelanocortingens (POMC), nämlich die in Seq.ID 8 (human POMC) wiedergegebene Sequenz.

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Dämpfung der Schmerzempfindung, insbesondere bei chronischen entzündlichen Erkrankungen, durch Expression körpereigener neuroendokriner Peptide an der Entzündungsstelle. Insbesondere betrifft die Erfindung die Expression von POMC oder CRF von lokal injizierten DNA-Expressionskonstrukten, vorzugsweise kovalent peptidmodifizierten Expressionskonstrukten.



Abb. 1

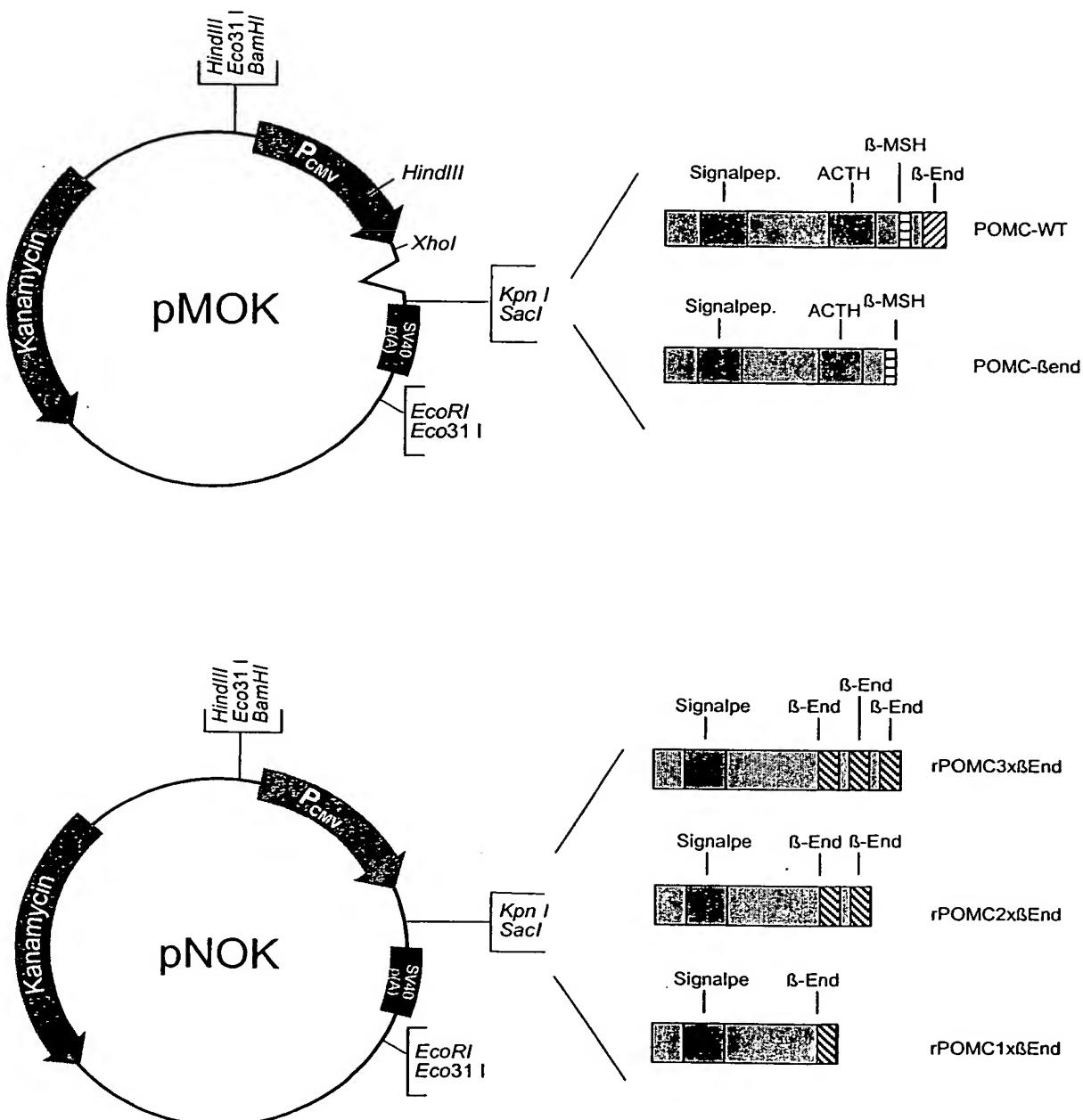


Abb. 2a RIA für  $\beta$  END im Zelllysat

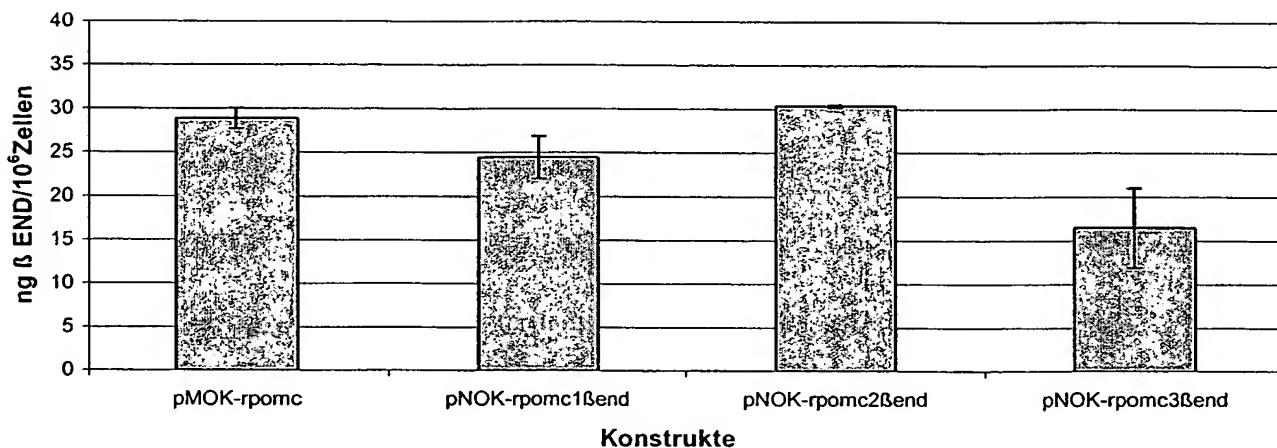
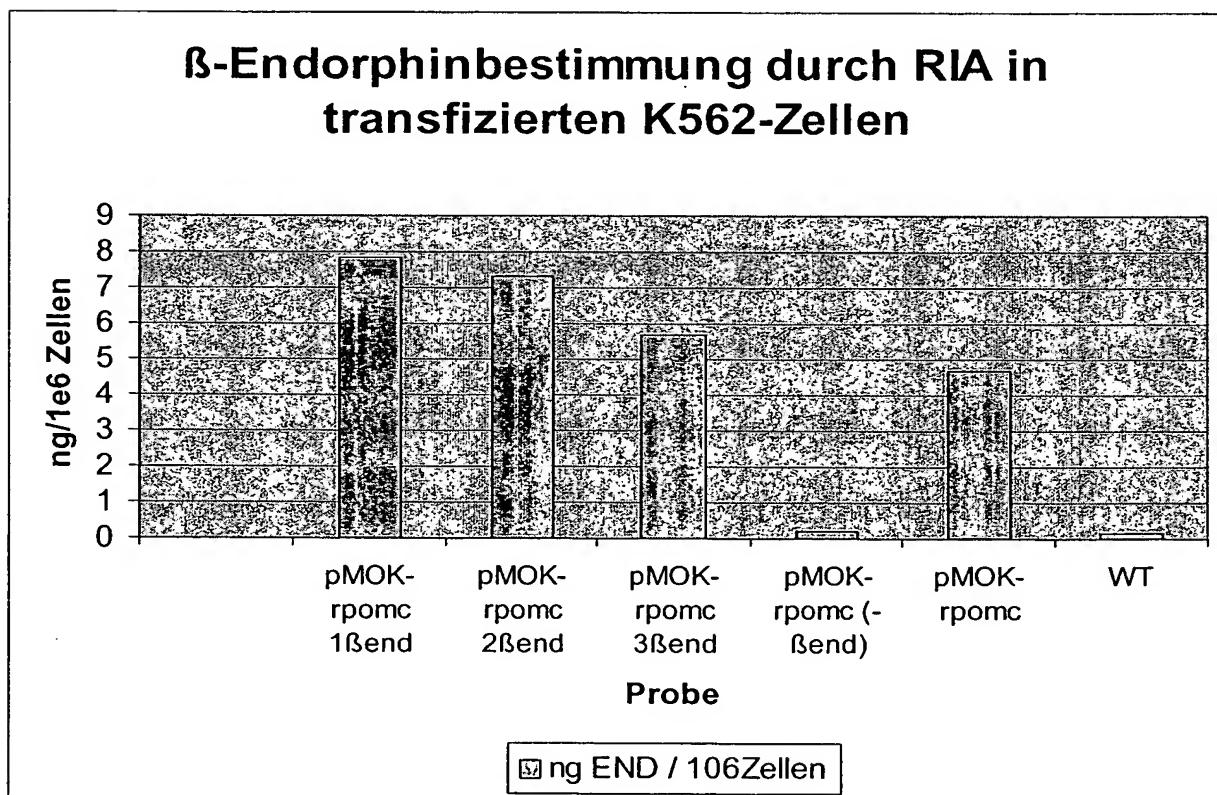
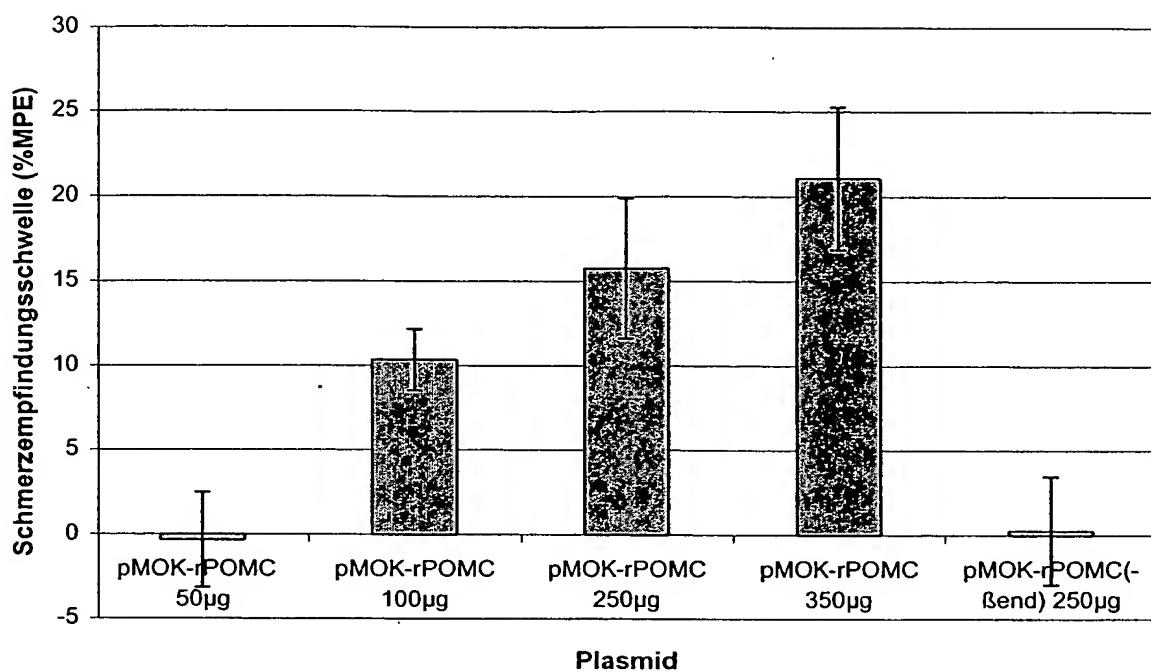


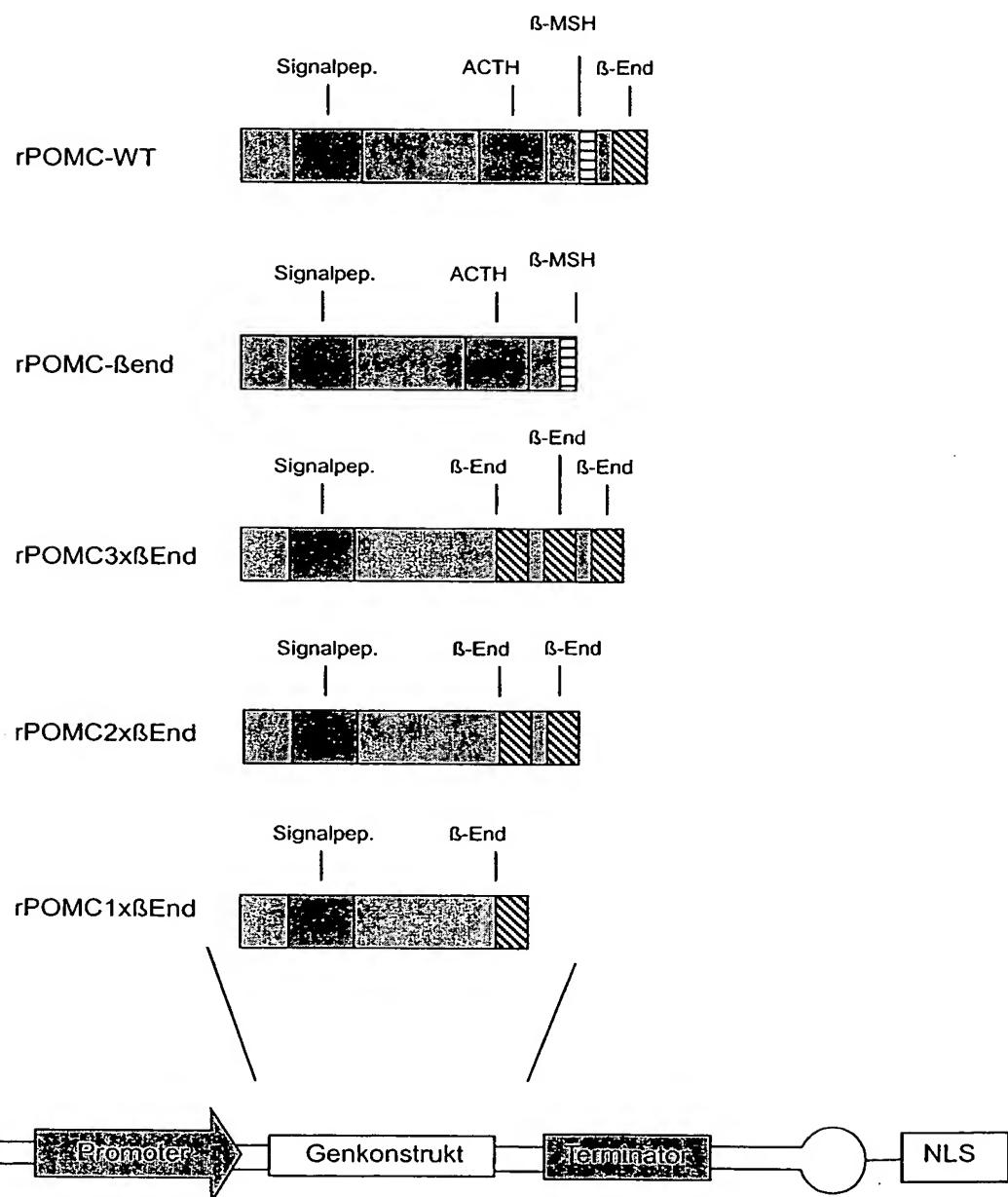
Abb. 2b



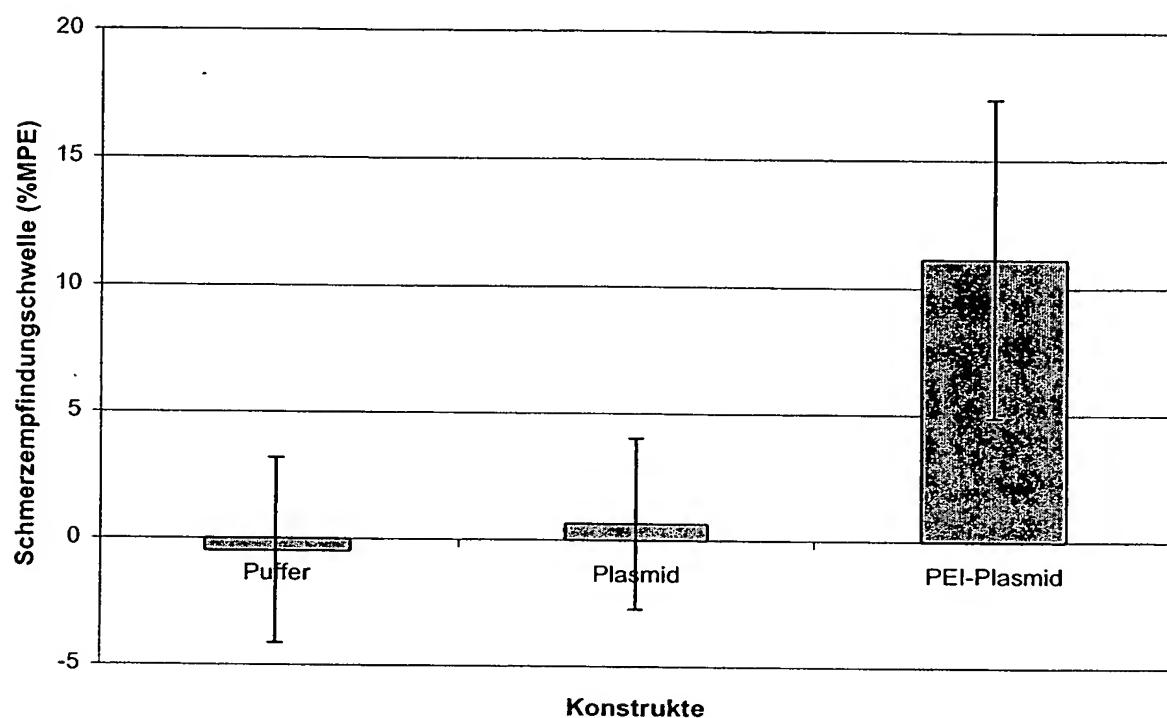
**Abb. 3 Schmerzdämpfung nach Injektion von Expressionskonstrukten für  $\beta$ -END**



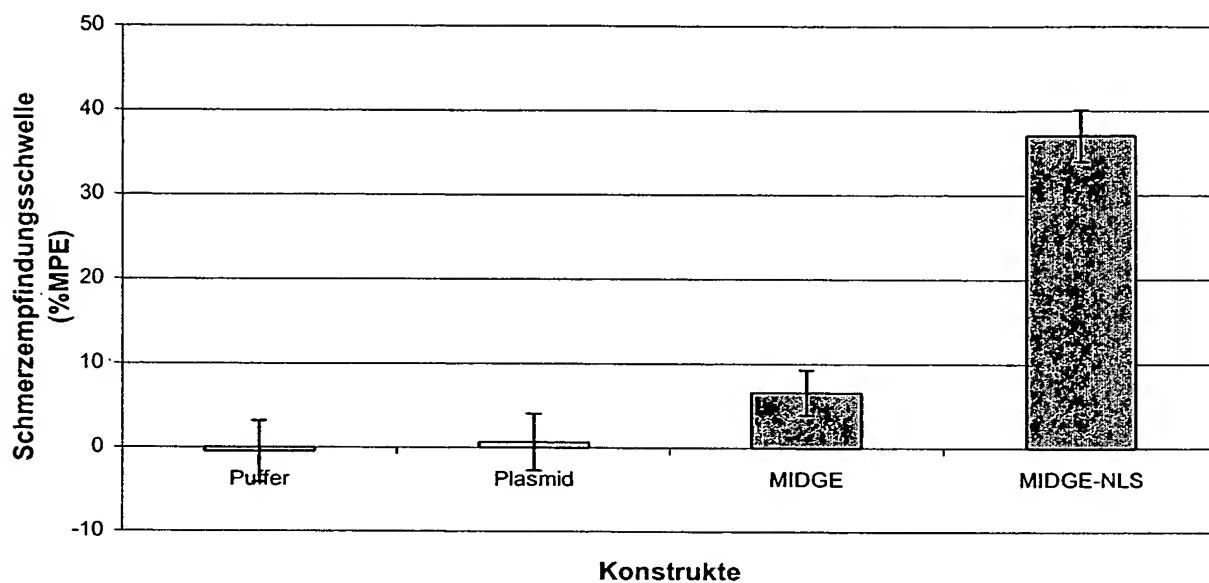
**Abb. 4**



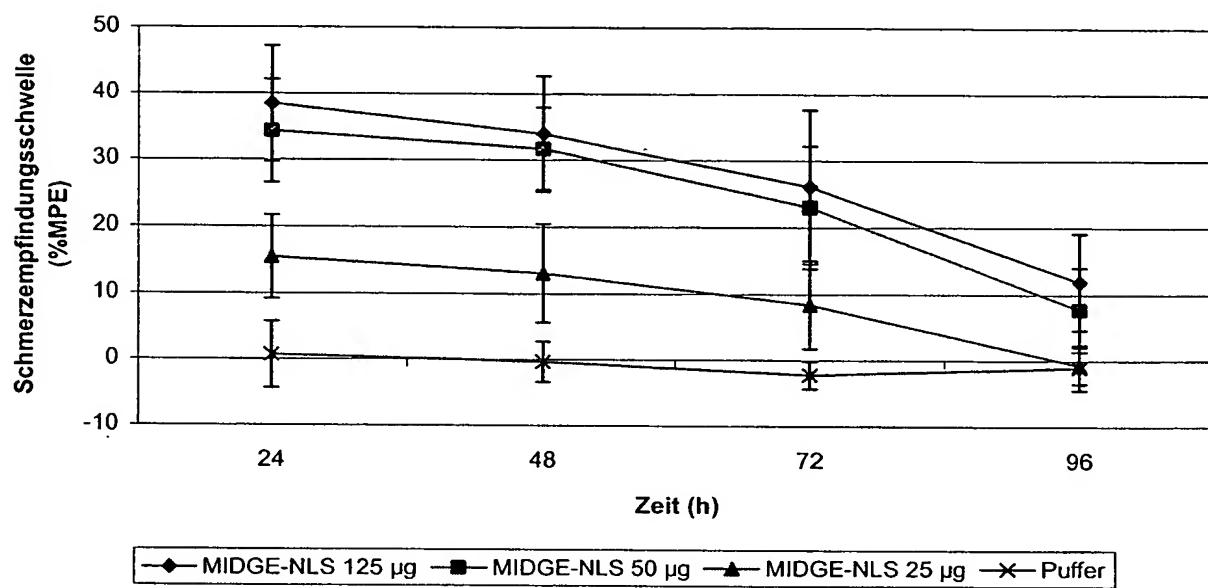
**Abb. 5 Vergleich der verstärkenden Wirkung von PEI bei Plasmid**



**Abb. 6 Vergleich der antinociceptiven Wirkung von Plasmid, MIDGE und MIDGE-NLS**



**Abb. 7 Antinociceptive Wirkung von MIDGE-rPOMC-NLS als Funktion der Zeit**



Mologen Schmerzbekämpfung.ST25  
SEQUENCE LISTING

<110> Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH

<120> Mittel zur lokalen Schmerzbehandlung

<130> XI 152/02

<150> DE 101 09 092.7

<151> 2001-02-24

<160> 10

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 535

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<220>

<221> Intron

<222> (446)..(532)

<223>  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<220>

<221> Intron

<222> (446)..(532)

<223>  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<400> 1  
atgaacttgg agacaggcag ccggggctca gagttcggca tgagcgcagt gagctgcggc 60  
aatgggaaac atgccgagat tctgctacag tcgctcaggg gccctgctgc tggccctcct 120  
gcttcagacc tccatagacg tgtggagctg gtgcctggag agcagccagt gccaggacct 180  
caccacggaa agcaacctgc tggcttgcatt ccgggcctgc agactcgacc tctcggcgga 240

Mologen Schmerzbekämpfung.ST25

gacgcccgtg	tttccaggca	acggagatga	acagcccttg	actgaaaatc	cccggaaagta	300
cgtcatgggt	cacttccgct	gggaccgctt	cggcccgaga	aacagcagca	gtgctggcgg	360
ctcagcgcag	aggcgtgcgg	aggaagagac	ggcggggggga	gatggccgtc	cggagccaag	420
tccacggag	ggcaagcgct	acggcggctt	catgacacctcc	gagaagagcc	agacgcccct	480
ggtgacgctc	ttcaagaacg	ccatcatcaa	gaacgtgcac	aagaagggcc	agtga	535

<210> 2

<211> 663

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<220>

<221> Intron

<222> (376)..(462)

<223>  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<220>

<221> Intron

<222> (475)..(562)

<223> second  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<220>

<221> Intron

<222> (574)..(660)

<223> third  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<400> 2

atgccgagat	tctgctacag	tcgctcaggg	gccctgctgc	tggccctcct	gcttcagacc	60
tccatagacg	tgtggagctg	gtgcctggag	agcagccagt	gccaggacct	caccacggaa	120
agcaacctgc	tggcttgcac	ccgggcctgc	agactcgacc	tctcggcgga	gacgcccgt	180
tttccaggca	acggagatga	acagcccttg	actgaaaatc	cccggaaagta	cgtcatgggt	240
cacttccgct	gggaccgctt	cggcccgaga	aacagcagca	gtgctggcgg	ctcagcgcag	300
aggcgtgcgg	aggaagagac	ggcggggggga	gatggccgtc	cggagccaag	tccacggag	360
ggcaagcgct	acggcggctt	catgacacctcc	gagaagagcc	agacgcccct	ggtgacgctc	420
ttcaagaacg	ccatcatcaa	gaacgtgcac	aagaagggcc	agaagcgcta	cggcggcttc	480

Mologen Schmerzbekämpfung.ST25

atgacacctcg	agaagagcca	gacgcccctg	gtgacgctct	tcaagaacgc	catcatcaag	540
aacgtgcaca	agaagggcca	gaagcgctac	ggcggcttca	tgacacctga	gaagagccag	600
acgcccctgg	tgacgctctt	caagaacgcc	atcatcaaga	acgtgcacaa	gaagggccag	660
tga						663

<210> 3

<211> 708

<212> DNA

<213> Rat

<400> 3						
atgccgagat	tctgctacag	tcgctcaggg	gccctgctgc	tggccctcct	gcttcagacc	60
tccatagacg	tgtggagctg	gtgcctggag	agcagccagt	gccaggacct	caccacggaa	120
agcaacctgc	tggcttgcac	ccgggcctgc	agactcgacc	tctcggcgg	gacgcccgtg	180
tttccaggca	acggagatga	acagcccttg	actgaaaatc	cccggaaagta	cgtcatgggt	240
cacttccgct	gggaccgcct	cggcccgaga	aacagcagca	gtgctggcgg	ctcagcgcag	300
aggcgtgcgg	aggaagagac	ggcggggggg	gatggccgtc	cggagccaag	tccacggag	360
ggcaagcgc	cctactccat	ggagcacttc	cgctggggca	agccgggtgg	caagaagcgg	420
cgcctgtga	aggtgtaccc	caatgtcgcc	gagaacgagt	cggccgaggc	cttccctcta	480
gagttcaaga	gggagctgga	aggcgagcag	cctgatggct	tggagcacgt	cctggagccg	540
gataccgaga	aggccgacgg	gccctatcgg	gtggagcact	tccgctgggg	caacccgccc	600
aaggacaagc	gctacggcgg	cttcatgacc	tccgagaaga	gccagacgcc	cctggtgacg	660
ctttcaaga	acgccccatcat	caagaacgtg	cacaagaagg	gccagtga		708

<210> 4

<211> 615

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<400> 4						
atgccgagat	tctgctacag	tcgctcaggg	gccctgctgc	tggccctcct	gcttcagacc	60
tccatagacg	tgtggagctg	gtgcctggag	agcagccagt	gccaggacct	caccacggaa	120
agcaacctgc	tggcttgcac	ccgggcctgc	agactcgacc	tctcggcgg	gacgcccgtg	180
tttccaggca	acggagatga	acagcccttg	actgaaaatc	cccggaaagta	cgtcatgggt	240
cacttccgct	gggaccgcct	cggcccgaga	aacagcagca	gtgctggcgg	ctcagcgcag	300
aggcgtgcgg	aggaagagac	ggcggggggg	gatggccgtc	cggagccaag	tccacggag	360

Mologen Schmerzbekämpfung.ST25

ggcaagcgct	cctactccat	ggagcacttc	cgctggggca	agccgggtgg	caagaagcgg	420
cgccctgtga	aggtgtaccc	caatgtcgcc	gagaacgagt	cggccgaggc	ctttccccta	480
gagttcaaga	gggagctgga	aggcgagcag	cctgatggct	tggagcacgt	cctggagccg	540
gataccgaga	aggccgacgg	gccctatcgg	gtggagcact	tccgctgggg	caacccgccc	600
aaggacaagc	gctga					615

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Simian virus 40

<400> 5

Pro	Lys	Lys	Lys	Arg	Lys	Val	Glu	Asp	Pro	Tyr	Cys
1				5					10		

<210> 6

<211> 1195

<212> DNA

<213> Rat

<400> 6

aaactcagag	cccaagtacg	ttgagaaaact	gaagagaaaag	gggaaaggca	aagaaaaggaa	60
gaagagaaaag	gagaagagga	agaaaacctg	caggaggcat	cctgagagag	gtacctcgca	120
gaacaacagt	gcgggctcac	ctgccaaggg	aggagaagag	agcgccttca	aacatgcggc	180
tgcggctgct	ggtgtccg	ggcatgctgc	tggtgctct	gtcgccctgt	ctgccttgca	240
ggccctgct	gagcagggga	tccgtctctg	gagcgccg	ggcccccgcag	ccgttgaatt	300
tcttgcaacc	ggagcagccc	cagcaacctc	agccgattct	gatccgcatt	ggtgaagaat	360
acttcctccg	cctggggAAC	ctcaacagaa	gtcccgtgc	tcggctgtcc	cccaactcca	420
cgccttcac	cgcgggtcgc	ggcagccg	cctcgacga	ccaggctgcg	gctaactttt	480
tccgcgtgtt	gctgcagcag	ctgcagatgc	ctcagcgccc	gctcgacagc	agcacggagc	540
tggcggAAC	cggcgccgag	gatgccctcg	gtggccacca	gggggcgtg	gagagggaga	600
ggcggtccga	ggagccccc	atctctctgg	atctcacctt	ccaccttctg	agggaaagtct	660
tggaaatggc	cagggcagag	cagttagctc	agcaagctca	cagcaacagg	aaactgatgg	720
agattatcgg	gaaatgaaat	gttgcgttg	gccaaaacga	ttctgcattt	agcacacaag	780
taaaaataaa	aaatttaaaa	cacagtattc	tgtaccatac	tgcagctctg	atatcatttg	840
tttattttta	tatagcttga	agcatagaag	atgtacaggg	agagaccta	tataccctt	900

Mologen Schmerzbekämpfung.ST25

aattagcatg	cacaaagtgt	gtttcttgt	agtaacaaaa	cagcgttatt	tgtattgttc	960
acgcttagtt	tctatgtgca	aataagtgtc	tttatacgta	tatcttaaag	aaaatgtgga	1020
tccaggagg	aaacctttaa	aaaagcagat	ggaagtcacc	cagttgttt	tatttgaga	1080
cacagtgtaa	gagaattcat	tcttgagggg	tggctaggac	aaaatgtgta	agctcttga	1140
atcaactttt	tcttgtaaat	gttcaataa	taaaacatct	ttctgatcct	tggtc	1195

<210> 7

<211> 564

<212> DNA

<213> synthetic sequence

<220>

<221> Intron

<222> (376)..(462)

<223>  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<220>

<221> Intron

<222> (475)..(562)

<223> second  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<400> 7	atgccgagat	tctgctacag	tcgctcaggg	gccctgctgc	tggccctcct	gcttcagacc	60
	tccatagacg	tgtggagctg	gtgcctggag	agcagccagt	gccaggacct	caccacggaa	120
	agcaacctgc	tggcttgcac	ccgggcctgc	agactcgacc	tctcggcgg	gacgcccgtg	180
	tttccaggca	acggagatga	acagcccttg	actgaaaatc	cccgaaagta	cgtcatgggt	240
	cacttccgct	gggaccgctt	cggcccggaga	aacagcagca	gtgctggcgg	ctcagcgcag	300
	aggcgtgcgg	aggaagagac	ggcgggggga	gatggccgtc	cggagccaaag	tccacgggag	360
	ggcaagcgt	acggcggctt	catgacctcc	gagaagagcc	agaccccct	ggtgacgctc	420
	ttcaagaacg	ccatcatcaa	gaacgtgcac	aagaagggcc	agaagcgcta	cggcggcttc	480
	atgacccctcg	agaagagcca	gacgccccctg	gtgacgctct	tcaagaacgc	catcatcaag	540
	aacgtgcaca	agaagggcc	gtga				564

<210> 8

<211> 936

Mologen Schmerzbekämpfung.ST25

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Intron

<222> (847)..(933)

<223>  $\beta$ -endorphin cDNA sequence

<400> 8	
atgccgagat cgtgctgcag ccgctcgaaa gcccgttgc tggccttgc gcttcaggcc	60
tccatggaaat tgcgtggctg gtgcctggag agcagccagt gtcaggaccc caccacggaa	120
agcaacacctgc tgaaggggat gggacaaaag aggccgtggc aagatcttag atgcccacga	180
gtgccaagaa agcaggtggg cagacctgccc tgcgtggagg cctcgacgct tgacacgccc	240
gacactgtgc cctgtgtcct cggcgagtgc atccgggcct gcaagcccgaa cctctcgcc	300
gagactccca tggcccgaaa aatggcgac gagcagccctc tgaccgagaa ccccccggaa	360
tacgtcatgg gccacttccg ctgggaccga ttccggccgc gcaacagcag cagcagcggc	420
agcagcggcg cagggcagaa gcgcgaggac gtctcagcgg gcgaagactg cggcccgctg	480
cctgagggcg gccccgagcc cgcgcgcgtat ggtgccaagc cgggcccccg cgagggcaag	540
cgctcctact ccatggagca ctccgcgtgg ggcaagccgg tggcaagaa gcggcgccca	600
gtgaagggtgt accctaacgg cggcgaggac gagtcggccg aggccttccc cctggagttc	660
aagagggagc tgactggcca gcgactccgg gagggagatg gccccgacgg ccctgcccgtat	720
gacggcgccag gggcccgaggc cgacactggag cacagcctgc tggccggc cgagaagaag	780
gacgagggcc cctacaggat ggagcacttc cgctggggca gcccggccaa ggacaagcgc	840
tacggcggtt tcatgacccctc cgagaagagc cagacgcccc tggtgacgct gttaaaaac	900
gccatcatca agaacgccta caagaaggc gagtga	936

<210> 9

<211> 87

<212> DNA

<213> RAT

<400> 9	
ggcttcatga ctccgagaa gagccagacg cccctggta cgctttcaa gaacgcattc	60
atcaagaacg tgcacaagaa gggccag	87

<210> 10

**Mologen Schmerzbekämpfung.ST25**

<211> 87

<212> DNA

<213> Human

<400> 10  
ggtttcatga cctccgagaa gagccagacg cccctggta cgctgttcaa aaacgccatc 60  
atcaagaacg cctacaagaa gggcgag 87